优质 L-门冬酰胺酶的开发与应用及重组表达研究进展

曾杰

（江苏恒瑞医药股份有限公司 国家靶向药物工程技术研究中心 连云港 222047）

摘要 L-门冬酰胺酶用于治疗急性淋巴细胞白血病与淋巴瘤,但高昂的价格限制了临床上的广泛应用，重组表达解决了成本的难题。L-门冬酰胺酶所具有的低谷氨酰胺酶活性是其副作用的根源，同时细菌来源的 L-门冬酰胺酶能导致危及生命的过敏反应，寻找副作用更低的优质 L-门冬酰胺酶及其修饰方法，成为研究的重点。本文综述了 L-门冬酰胺酶重组表达概况，及具有更优性质的 L-门冬酰胺酶开发进展，并阐明其在临床治疗及食品工业领域的巨大应用潜力。

关键词 门冬酰胺酶 重组表达 毒副作用 急性淋巴细胞白血病 丙烯酰胺

中图分类号 Q81

白血病及淋巴瘤是最常见的造血系统恶性疾病，其中淋巴瘤的发生率约 4%，是增长最迅速的恶性肿瘤之一。白血病的发病率约为十万分之四，每年新增约 4 万例白血病患者，其中 40%是儿童，并以 2～7 岁儿童居多，且 70%-80%为急性淋巴细胞白血病。其病因可能与病毒感染、家族遗传有关，室内及室外环境污染理化刺激也是重要的诱因。对白血病及淋巴瘤患者的有效治疗，成为中国乃至全球最重要的课题之一。L-门冬酰胺酶作为治疗急性淋巴细胞白血病及淋巴瘤的药物，其昂贵的价格限制了临床上的广泛运用。利用基因工程技术重组表达 L-门冬酰胺酶，产量高，能够有效降低生产成本，促使价格更低廉的 L-门冬酰胺酶出现。但市场上现存的 L-门冬酰胺酶药物均存在多种副作用与不足，如过敏反应、免疫抑制、胰腺炎、神经毒性、肝炎、凝血障碍、产生抗体治疗失败等。开发副作用更低的优质 L-门冬酰胺酶及对其进行适当修饰成为解决这些弊端行之有效的途径。同时，除了应用在临床治疗领域，L-门冬酰胺酶能够减少加热食物过程中 L-门冬酰胺与还原性糖的美拉德反应产生的致癌物质丙烯酰胺，在食品工业领域同样具有广阔的应用前景。

1 L-门冬酰胺酶概述

1.1 L-门冬酰胺酶的历史

1953 年，Kidd[1]首次发现豚鼠血清能够抑制小鼠体内的淋巴瘤，1961 年，Broome[2]第一个证实了豚鼠血清中的抗肿瘤活性成分为 L-门冬酰胺酶，1964 年，Mashburn 等[3]发现大肠杆菌中的 L-门冬酰胺酶（L-Asparaginase，EC 3.5.1.1）具有抗肿瘤活性，从此开始了大肠杆菌 L-门冬酰胺酶药物开发的研究。1978 年，第一个被 FDA 批准用于治疗急性淋巴细胞白血病（acute lymphoblastic leukemia，ALL）的 L-门冬酰胺酶药物造福癌症患者，现在已成为治疗儿童 ALL 联合化疗的重要化药组合。

1.2 L-门冬酰胺酶的性质

大肠杆菌的 L-门冬酰胺酶分为 I 型与 II 型，L-门冬酰胺酶 I（EC1，Km= 5 mM）组成型表达于细胞质中，能够水解 L-门冬酰胺（L-Asn）与 L-谷氨酰胺（L-Gln），但对 L-Asn 的亲和力低；L-门冬酰胺酶 II（EC2，Km=12.5 μM）在缺氧条件下诱导表达，分泌到周质空腔中，对 L-Asn 具有高特异的水解活性[4]。L-门冬酰胺酶 II 由 4 个相同的亚基组成，每个亚基含有 326 个氨基酸，且只有四聚体才具有酶活性，分子量为 141kD[5]。

1.3 L-门冬酰胺酶的抗肿瘤机制

L-门冬酰胺酶 II 可以用于治疗霍奇金病（hodgkin disease），急性髓细胞白血病（acute myelocytic leukemia），急性髓单核细胞性白血病（acute myelomonocytic leukemia），慢性淋巴细胞白血病（chronic lymphocytic leukemia），淋巴肉瘤（lymphosarcoma），黑色素肉瘤（melanosarcoma）等[6]。其抗肿瘤的机制[7]是，肿瘤细胞如淋巴瘤自身不能合成 L-门冬酰胺，它们的快速增殖依赖于外源的 L-门冬酰胺，而人体自身细胞具有 L-门冬酰胺酶合成酶，能够合成 L-门冬酰胺满足正常代谢所需，L-门冬酰胺酶通过降解 L-门冬酰胺而杀死肿瘤细胞。

1.4 L-门冬酰胺酶药物

目前市场上的 L-门冬酰胺酶有多个品牌（见表 1），但主要来源于 *Escherichia coli* 与 *Erwinia* 两种革兰氏阴性菌。大肠杆菌来源的 L-门冬酰胺酶（*E. coli* ASNase）并不完美，因超敏反应与体内产生 L-门冬酰胺酶抗体而治

疗无效的比例高达 60%[8]。欧文氏菌来源的 L-门冬酰胺酶（Erwinase）作为二线药物被 FDA 批准用于治疗对 *E. coli* ASNase 有超敏反应的急性淋巴细胞性白血病（ALL）患者。

培门冬酶是聚乙二醇修饰的 L-门冬酰胺酶（[PEG]-*E. coli* ASNase），具有免疫原性低，半衰期长的优点，现作为一线药物用于治疗产生 *E. Coli* ASNase 抗体而治疗失败的 ALL 患者，其销售价格是 *E. Coli* ASNase 的 10 倍以上，目前国内仅有江苏恒瑞医药股份有限公司生产。

表 1 L-门冬酰胺酶药物的品牌

Table1 The brand of L-Asparaginase

Brand of Asparaginase	Origin	Corporation[8]
ELSPAR®	*E.coli* ASNase	Merck & Co, Inc.; Ovation Pharmaceuticals, USA
Oncaspar TM	polyethylene glycol [PEG]-*E.coli* ASNase	Enzon Pharmaceuticals Inc.; Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc., USA
Crasnitin TM	*E.coli* ASNase	Bayer , Germany
Medac TM	*E.coli* ASNase	Kyowa Hakko, Japan
Erwinase®	*Erwinia chrysanthemi*	Speywood Pharmaceuticals, Inc.; EUSA Pharma, UK
Kidrolase®	*E.coli*-asparaginase	EUSA Pharma, UK
Leunase®	*E.coli* ASNase	Sanofi-Aventis, France
Leucoginase	-	VHB Life Science Inc., India
Spectrila®	*E.coli* ASNase	Medac GmbH
Pegaspargase®	polyethylene glycol [PEG]-*E.coli* ASNase	Jiang Su Heng Rui Medicine Co. Ltd, China

1.5 L-门冬酰胺酶的来源

L-门冬酰胺酶在大自然中来源十分广泛[6,7,9]，例如细菌、放线菌、真菌、酵母、海藻、植物等，但是人没有。除了大肠埃希氏杆菌（*Escherichia coli*）产 L-门冬酰胺酶以外，还有欧文氏菌如菊欧文氏菌（*Erwinia chrysanthemi*）、胡萝卜软腐欧文氏菌（*Erwinia carotovora*）、白菜软腐欧文氏菌（*Erwinia aroideae*）；芽孢杆菌如马铃薯芽孢杆菌（糖化菌）（*Bacillus mesentericus*）、多粘芽孢杆菌（*Bacillus polymyxa*）；放线菌如海洋放线菌（*Marine Actinomycetes*）、链霉菌（*Streptomyces*）；嗜热菌如嗜热水生菌（*Thermus aquaticus*）、激烈火球菌（*Pyrococcus furiosus*）等。产 L-门冬酰胺酶的真菌有霉菌如黑曲霉（*Aspergillus niger*）、土曲霉(*Aspergillus terreus*)；酵母菌如酿酒酵母（*Saccharomyces cervisiae* ），多形毕赤氏酵母(*Pichia polymorpha*)。目前的研究热点致力于寻找具有更优性质的 L-门冬酰胺酶，海洋

微生物[9]及真菌有着巨大的开发潜力。

2 L-门冬酰胺酶的微生物发酵

2.1 大肠杆菌发酵

最初的 L-门冬酰胺酶药物在大肠杆菌中提取获得，在缺氧的条件下，且富含多种氨基酸的培养基中培养大肠杆菌，其 L-门冬酰胺酶产量能够提高 100-1000 倍[10]。经过深入研究发现大肠杆菌的 L-门冬酰胺酶发酵受到两个因素的调控，其 L-门冬酰胺酶 II 基因（*ansB* 基因）的启动子受到 cAMP 受体蛋白（cyclic AMP receptor protein，CRP 蛋白）的正性调控与厌氧条件（FNR 蛋白）的负性调控[11]。CRP 蛋白又叫代谢激活蛋白（Catabolite Activator Protein，CAP），胞内低水平的葡萄糖导致 cAMP 升高，从而产生高水平的 cAMP-CAP 复合物，*ansB* 基因的启动子-10 区与-35 区与大肠杆菌 σ 70 RNA 聚合酶不能完美的结合，cAMP-CAP 复合物结合 *ansB* 启动子区域的 CAP 结合位点，帮助 σ 70 RNA 聚合酶与 *ansB* 启动子的结合，从而增强 *ansB* 基因的表达[12]。相反，葡萄糖能够显著抑制 *ansB* 基因的表达[10]。

2.2 真菌发酵

细菌来源的酶通常能导致过敏反应而危及生命，而真菌来源的酶没有过敏反应的副作用[7]。利用低成本的农业原料进行固相发酵生产 L-门冬酰胺酶的创新模式，不仅具有环境友好型的特点，还能解决现存药物过敏反应的副作用，是最近的研究热点。2013 年，Varalakshmi 等[13]使用土曲霉（*Aspergillus terreus*）MTCC 1782 以珍珠粟子粉（bajra seed flour）为单一农业原料成功进行了固相发酵生产 L-门冬酰胺酶。在最佳发酵参数条件下（湿度 70%，温度 30℃，pH8.0，1.5% （w/v）葡萄糖为碳源，2%（w/v） 硫酸铵为氮源，0.1% （w/v）硫酸镁），获得最高产量 273.3 IU/gds（gram dry substrate）。2015 年，Vijay 等[14]成功优化了农业原料如御谷（pearl millet），龙爪稷（finger millet），大豆，大麦，米糠等的混合比例，使用土曲霉 MTCC 1782 进行固相发酵 96h，产量比单一农业原料提高 2 倍以上（306.13 IU/gds）。

3 L-门冬酰胺酶的重组表达

目前 L-门冬酰胺酶的生产趋势已从微生物天然表达转为工程菌重组表达（见表 2），主要为以下三个表达系统。

3.1 大肠杆菌表达系统

大肠杆菌表达系统能够适应高密度发酵，培养成本低，表达产量高，生产周期短，因而得到广泛应用。影响重组蛋白表达产量的因素有宿主菌、信号肽、培养基组分等。

3.1.1 宿主菌的选择 *E. coli*基因组上的*ansB*基因可能与重组表达载体上的*ansB*基因发生同源重组，影响E. coli基因组的稳定性及质粒的保有率。BLR（DE3）宿主菌的*recA*基因变异，降低了同源重组发生的频率，因而能够稳定串联重复序列，是表达L-门冬酰胺酶的理想宿主菌。Khushoo等[15]将*E. coli*的*ansB*基因克隆到pET22b，使用pelB信号肽，在BL21 (DE3)、BL21star (DE3) 及BLR(DE3)宿主菌中重组表达，其中在BLR(DE3)宿主菌获得最高的分泌表达产量（30.67 IU/mL）。通过Fed-batch发酵流加补料维持比生长速率0.3/h，在不同生长阶段（OD600=33，60，90，135）进行IPTG 诱导，其中当OD600=90开始诱导，获得最高产量8.7×10^5 IU/L（折合为5.24g/L）。

3.1.2 信号肽的选择 大肠杆菌能以可溶性蛋白形式表达，定位于胞质或周质空腔中，并以泄露的机制分泌到细胞外[16]。这种分泌机制与蛋白质的分选信号肽有关，不同的信号肽，分泌效率不一样，蛋白表达产量也不一样。在大肠杆菌中能够有效将重组蛋白分泌到胞外的信号肽有PelB、OmpA、StII等。*E. coli*的*ansB*基因含有天然的L-门冬酰胺酶信号序列，2011年，Aghaeepoor等[17]成功将*ansB*基因的天然信号序列换成了pelB信号序列进行重组表达，产量最高达130 IU/mL。

大肠杆菌同样能以包涵体（inclusion bodies，IBs）形式表达，在胞质中积累。去掉*ansB*基因的天然信号肽序列，则以包涵体形式表达。包涵体具有抗蛋白酶，对宿主毒性小，容易富集纯化等优点，但是包涵体的正确折叠复性是一个具有挑战性的课题。2014年，Upadhyay等[18]成功以包涵体形式重组表达L-门冬酰胺酶。采用脉冲稀释方法（pulsatile dilution method）将含有4M尿素的裂解液在0.5M尿素（含0.1M盐酸胍）的复性液中重新折叠成有活性的四聚体，复性回收率达50%。

3.1.3 培养基组分的优化 2015年，Ghoshoon等[19]成功利用响应面分析（Response Surface Methodology，RSM）建立了培养基组分与产量的模型，采用最优的培养基组分（7.75 g/L胰蛋白胨，5.25 g蛋白胨，9 g/L酵母粉，0.6 g/L氯化钙），

在 BL21(DE3)宿主菌中重组表达，摇瓶表达水平的产量最高达 17,386 IU/L，与该模型的预测值只有 1.7%的差异，为今后利用 DoE 理念优化发酵工艺参数提供参考意义。

3.2 枯草芽孢杆菌表达系统

枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）是革兰氏阳性菌，主要用于食品工业，是当今工业酶生产应用最广泛的菌种之一。枯草芽孢杆菌表达系统具有诸多的优点，例如它是非病原菌，相对大肠杆菌表达系统而言，具有强大的蛋白分泌能力，分泌到胞外的蛋白易于纯化[20]。2017 年，Feng Y 等[21]将 *Bacillus subtilis* 168 的 L-门冬酰胺酶 II 基因克隆到带有 p43 强启动子的表达载体 pP43NMK 中，成功在 *Bacillus subtilis* WB600 宿主菌中重组表达，通过多个组合策略提高 L-门冬酰胺酶产量。例如从 8 个信号肽中筛选出能获得最高产量的 wapA 信号肽，通过点突变 PCR 改造 P43 进一步增强启动子，去掉 L-门冬酰胺酶 N 端 25 个氨基酸残基使产量在原有基础上翻倍。综合上述策略，在 3L 生物反应器中采用批次流加补料策略发酵，获得产量 407.6 IU/mL（折合 2.5g/L），这是在食品级宿主菌中获得的前所未有的最高 L-门冬酰胺酶产量，对 L-门冬酰胺酶在食品工业方面的应用带来新的突破。通过进一步研究，*Bacillus subtilis* 168 的 L-门冬酰胺酶在 65℃具有最高酶活性，Km 为 5.29mM，Kcat 为 54.4 s^{-1}。

3.3 毕赤酵母表达系统

巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）表达系统能对蛋白进行加工、折叠、翻译后修饰，适应高密度发酵，产量高，产品易于纯化，选择在毕赤酵母中重组表达真菌来源的 L-门冬酰胺酶是一个不错的选择。细菌来源的 L-门冬酰胺酶所具有的谷氨酰胺酶活性与脲酶活性是导致副作用的根源，而且还可能导致过敏反应而危及生命，而真菌来源的酶一般很少有过敏反应的副作用[7,22]。市场上的 L-门冬酰胺酶主要来源于细菌，均具有严重的免疫原性反应、免疫抑制、超敏反应、血栓及出血等副作用。

酿酒酵母中的 *ASP3* 基因编码的 L-门冬酰胺酶 II 是一个潜在的替代药物，为了克服酿酒酵母中 L-门冬酰胺酶 II 的产量限制，Ferrara 等[23]利用 *Pichia pastoris* 成功重组表达 *ASP3* 基因编码的 L-门冬酰胺酶 II，产量达到 800 IU/g，是酿酒酵母产量的 7 倍。通过高密度发酵，产量提高到 85,600 IU/L，提高了 100

倍。2016 年，Facchinetti 等[24]同样成功在毕赤酵母中重组表达了 *ASP3* 基因，并对酿酒酵母的 L-门冬酰胺酶 II 的结构及功能进行了深入研究。该蛋白含有大量的α螺旋，在β折叠的贡献下，使其能在 45℃高温及宽泛的 pH（6-10）条件下保持稳定。酶活性最佳条件为 46℃，pH7.2，在人体生理温度 37℃放置 30min，仍保留有 92%的酶活性，并在体外实验中表现出了对白血病细胞系 K562 的抗肿瘤活性。同时，2016 年，Costa 等[25]也研究了酿酒酵母的 ASP1 基因，并成功在 BL21(DE3) 中重组表达，揭示了负责催化功能的 4 个氨基酸为 T64-Y78-T141-K215。其酶比活为 196.2 I U/mg ，并对谷氨酰胺具有低酶活性，酶比活为 0.4 ± 0.02 IU/mg。在体外实验中，对淋巴细胞系 MOLT-4 具有抗肿瘤活性。

4. 无谷氨酰胺酶活性的 L-门冬酰胺酶重组表达

L-门冬酰胺酶具备的低谷氨酰胺酶活性是其产生毒副作用的根源，例如神经毒性，肝炎，凝血障碍等[26]，因此，迫切需要寻找无谷氨酰胺酶活性的 L-门冬酰胺酶来源（见表 3）。

4.1 细菌来源

胡萝卜软腐欧文氏菌（*Erwinia carotovora* NCYC 1526 ）的 L-门冬酰胺酶（ErA）具有更低的谷氨酰胺酶活性，其在临床上可能具有更少的副作用。2014 年，Pourhossein 等[26]在 BL21(DE3)中重组表达 ErA，测得酶比活为 430 IU/mg。胡萝卜软腐果胶杆菌（*Pectobacterium carotovorum*）MTCC 1428 的 L-门冬酰胺酶无谷氨酰胺酶活性。2015 年，Chityala 等[27]将该酶在枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis* WB800N）中进行了重组表达，表达载体为 pHT43。通过单因子（One Factor at a Time Strategy, OFAT）方法获得最佳表达条件，摇瓶表达产量最高达 105 IU/ml，酶比活为 101 IU/mg。通过分子模型分析，60 位甘氨酸、119 位甘氨酸、252 位丙氨酸是该酶的活性位点。来自拟诺卡氏菌（*Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08）的 L-门冬酰胺酶也无谷氨酰胺酶活性。2016 年，Meena 等[28]在大肠杆菌 *E. coli* M15(pREP4)中重组表达该酶。重组表达产量为 158.1 IU/mL，酶比活为 60.26 IU/mg，在 37℃，pH8.0 显示最佳酶活性。2016 年，Lee 等[29]发现了酶比活更高的无谷氨酰胺酶活性的 L-门冬酰胺酶。来自中温黄杆菌(*Mesoflavibacter*)的 L-门冬酰胺酶（L-ASPG86）有 344 个氨基酸，与大肠埃希

表 2 L-门冬酰胺酶的重组表达

Table 2 Recombinant expression of L-asparaginase

文献报道	来源	信号肽	表达载体	宿主菌	发酵方式	产量
Aghaeepoor M, 2011 [17]	*Escherichia coli*	PelB	pET3a	BL21(DE3)	fed-batch	130 IU/mL
Khushoo A, 2005 [15]	*Escherichia coli*	PelB	pET22b	BLR (DE3)	Fed-batch	870 IU /mL(5.24g/ L)
Wang Y, 2001 [41]	*Escherichia coli* AS1.357	Native signal peptide	pBV220	*E.coli* AS1.357	NR	228 IU/mL
Upadhyay A K, 2014 [18]	*Escherichia coli* K-12 (JM109)	Without signal peptide	pET14b	BL21(DE3)	shake-flask	118 mg/L
Ghoshoon M B, 2015 [19]	*Escherichia coli* YG 002	Native signal peptide	pET-15b	BL21(DE3)	shake-flask	17.4 IU/mL
Roth G, 2013 [42]	*Erwinia carotovora*	Native signal peptide	pET-30a	C43 (DE3)	fed-batch	0.9 g/L
Chityala S, 2015 [27]	*Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428	Without signal peptide	pHT43	*Bacillus subtilis* WB800N	shake-flask	105 IU/mL
Feng Y, 2017 [21]	*Bacillus subtilis* 168	WapA signal peptide	pP43NMK	*Bacillus subtilis* WB600	fed-batch (3L)	407.6 IU/mL (2.5 g/L)
Meena B, 2016 [28]	*Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08	NR	pQE30	*E.coli* M15	shake-flask	158 IU/mL
Hong S J, 2014 [34]	*Thermococcus kodakarensis* KOD1	Without signal peptide	pET-21a	BLR (DE3)	shake-flask	NR
Ferrara M A, 2006 [23]; Facchinetti C G, 2016 [24]	*Saccharomy cescerevisiae* (*ASP3*)	α-factor signal peptide	pPIC9	*Pichia pastoris*	fed-batch (2L)	85.6 IU/mL
Costa I M, 2016 [25]	*Saccharomyces cerevisiae* BY4741(*ASP1*)	NR	pET15b	BL21 (DE3)	shake-flask	NR

One unit of enzyme activity(IU) was defined as the amount of an enzyme required to release 1 μmol of ammonia per min.

NR: Not report

氏杆菌和假结核耶尔森菌（*Yersinia pseudotuberculosis*）的 I 型 L-门冬酰胺酶同源，但是 L-ASPG86 无谷氨酰胺酶活性。在 BL21(DE3)中重组表达 L-ASPG86，5mM 锰离子与镁离子能够使酶活分别提高 3.97 倍和 3.35 倍。在最佳条件下（37℃、pH9、5mM MnSO4），酶比活为 687.1 IU/mg，是 *E. coli*-ASNase 的 2 倍多。

4.2 真菌来源

2014 年，Nagarajan 等[30]首次报道了从植物中筛选得到的内生真菌（*Alternaria sp.*）产的 L-门冬酰胺酶无谷氨酰胺酶活性，酶比活为 1.65 IU/mg。2016 年，Doriya[22]成功筛选出无谷氨酰胺酶活性且无脲酶活性的产 L-门冬酰胺酶菌株。通过平板培养法对真菌的表型进行筛选，在以 L-Gln 或尿素作为唯一氮源的改良察氏培养基（Modified Czapek-Dox, MCD）中添加酚红或溴麝香草酚蓝（BTB），通过培养平板颜色变化判断有无谷氨酰胺酶活性与脲酶活性。从 45 个真菌中筛选出 4 株不含有上述两种酶活性的 L-门冬酰胺酶，其中 C7 菌株的产量最高（33.59 IU/mL），酶比活为 64.85 IU/mg，并从形态学上鉴定该 C7 菌株为曲霉(*Aspergillus sp.*)。

表 3 副作用更低的 L-门冬酰胺酶

Table 3 L-Asparaginase with low adverse effects

文献报道	来源	特点	酶比活
Pourhossein M, 2014 [26]	*Erwinia carotovora* NCYC 1526	decreased glutaminase activity	430 IU/mg
Nagarajan A, 2014 [30]	*Alternaria sp.*	free of glutaminase	1.65 IU/mg
Chityala S, 2015 [27]	*Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428	free of glutaminase	101 IU/mg
Meena B, 2016 [28]	*Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08	free of glutaminase	60.26 IU/mg
Lee S J, 2016 [29]	*Mesoflavibacter*	free of glutaminase	687.1 IU/mg
Doriya K, 2016 [22]	*Aspergillus sp.*	free of glutaminase and urease	64.85 IU/mg

5. 耐高温 L-门冬酰胺酶的重组表达

L-门冬酰胺与还原性糖在加热的条件下发生美拉德（Maillard）反应产生致癌物质丙烯酰胺（acrylamide），L-门冬酰胺酶能够减少美拉德反应产生的致癌物质丙烯酰胺，又不影响到美拉德反应赋予美食的色香味[31, 32]。L-门冬酰胺酶在食品工业的应用具有广阔的前景，例如，枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*

B11-06）的 L-门冬酰胺酶耐高温度，在油炸土豆工艺中减少丙烯酰胺的形成具有潜在的工业应用价值。2013 年，Jia 等[33]将其 L-门冬酰胺酶基因克隆到 pMA5 载体中，在 *Bacillus subtilis* 168 宿主菌中重组表达，产量远高于 *Bacillus subtilis* B11-06，达到 9.98 IU/mL。进一步研究该酶的性质，酶活最佳条件为 40℃，pH7.5，Km 为 0.43mM，Vmax 为 77.51μM/min。2014 年，Hong 等[34]对另一种耐高温的 L-门冬酰胺酶进行了深入研究，在 BLR(DE3)中重组表达嗜热古细菌（*Thermococcus kodakarensis* KOD1）的 L-门冬酰胺酶，其最佳酶活性条件为 90℃、pH8.0，酶促反应动力学参数 Km 为 2.6mM， Kcat 为 694 s^{-1}。其中，二价铜离子与二价镍离子能有效抑制该酶活性。酶比活高达 978.7 IU/mg，在 90℃条件下 32h，仍有 90%的酶活性，这种特征，使其在食品工业领域具有广阔的应用前景。2014 年，Huang 等[35]发现酶比活更高的耐高温 L-门冬酰胺酶，在 *E. coli* 中重组表达黑根毛霉（*rhizomucor miehei*）的 L-门冬酰胺酶（RmAsnase），其酶比活高达 1985 IU/mg，最佳酶活性条件为 45℃、pH7.0。此外，RmAsnase 具有很低的谷氨酰胺酶活性，且能促进凝集素（lectin）诱导的白血病细胞 K562 细胞凋亡，在食品工业方面的应用及白血病的治疗中具有广阔的前景。

6. L-门冬酰胺酶治疗的其他改进

6.1 L-门冬酰胺酶免疫抑制及胰腺炎副作用的克服

2011 年，欧文氏菌来源的 L-门冬酰胺酶 Erwinase 作为二线药物被 FDA 批准用于治疗对大肠杆菌来源的 L-门冬酰胺酶有超敏反应的急性淋巴细胞性白血病(ALL)患者。而 Erwinase 会带来严重的免疫抑制副作用，限制了它在临床上的应用。激活巨噬细胞的自噬能够克服 Erwinase 带来的免疫抑制副作用[36]，这一发现给临床治疗上带来的新的方向。2017 年，Sakaguchi 等[37]通过统计发生 L-门冬酰胺酶引起的急性胰腺炎的病人接受奥曲肽（octreotide）治疗的情况，发现奥曲肽具有预防 L-门冬酰胺酶引起的严重胰腺炎的作用，为 L-门冬酰胺酶的临床治疗提供了多药组合联合治疗的新方案。

6.2 L-门冬酰胺酶纳米粒子

静脉注射 L-门冬酰胺酶存在一些副作用，以纳米粒子作为 L-门冬酰胺酶载体的纳米级颗粒药物是一种新型的药物载体输送系统，能够增加生物膜的透过性，增强药效，降低药物毒性，改变药物在体内的分布，提高生物利用度。2014

年，Bahreini 等[38]将 *ansB* 基因克隆到 pAED4 表达载体中，在 BL21pLysS（DE3）中重组表达，将表达产物 L-门冬酰胺酶与壳聚糖（chitosan）连接制成纳米颗粒药物，大小为 340±12 nm，其在体内具有更长的半衰期。2015 年，Baskar 等[39]将土曲霉（*Aspergillus terreus*）产的 L-门冬酰胺酶与氧化锌交联制备成纳米颗粒复合物，扫描电镜观察为 28-63nm，将该纳米颗粒复合物对人乳腺癌细胞系 MCF-7 进行处理，MTT 法测试发现细胞存活率下降至 35.02%，显示了氧化锌交联的 L-门冬酰胺酶纳米颗粒复合物具有良好的抗肿瘤活性。

6.3 L-门冬酰胺酶的微生物治疗

2015 年，Kim 等[40]将鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）进行基因改造，在诱导型启动子 araBAD 控制下选择性在实体肿瘤中重组表达 L-门冬酰胺酶。动物试验表明，用该菌作为抗肿瘤药物的载体，在肿瘤组织的微环境中，具有高效的选择性与抗肿瘤作用。

7. 结语和展望

天然 L-门冬酰胺酶的生物发酵已不能满足市场的需求，重组 L-门冬酰胺酶已是大势所趋。大肠杆菌表达系统及毕赤酵母表达系统是 L-门冬酰胺酶重组表达最常见的两个表达系统，分别重组表达细菌及真菌来源的 L-门冬酰胺酶。经过近些年的研究优化，在产量方面已经不是限制因素。大肠杆菌表达系统常与 pET 表达载体系统配合，本实验室利用该系统重组表达 L-门冬酰胺酶的产量能够达到 5g/L 以上；毕赤酵母表达系统常与甲醇诱导型表达载体配合，可实现高产量的分泌表达。虽然攻克了产量的限制，但现存的 L-门冬酰胺酶药物仍存在诸多副作用与不足而影响其治疗效果，如过敏反应、免疫抑制、胰腺炎、神经毒性、肝炎、凝血障碍、产生抗体治疗失败等。

本文首次综述了近些年最新报道的副作用更低的门冬酰胺酶候选药物，为 Me-Better 类创新药物的开发提供参考价值，有望打破长期以来昂贵的进口门冬酰胺酶药物的垄断地位。通过本文对近几年研究成果的综述，从以下四个方面可有效改善上述弊端：1、细菌来源的 L-门冬酰胺酶往往能够发生危机生命的过敏反应，而真菌来源的 L-门冬酰胺酶是减少过敏反应发生的潜在替代药物。2、L-门冬酰胺酶所具有的低谷氨酰胺酶活性及脲酶活性是其产生副作用的根源，寻找及开发无谷氨酰胺酶活性及脲酶活性的新来源 L-门冬酰胺酶成为行之有效的解

决途径。3、对 L-门冬酰胺酶进行修饰，并制备成纳米级颗粒药物，作为一种新型的药物载体输送系统，具有增加生物膜的透过性、增强药效、降低药物毒性、提高生物利用度等优点。4、对微生物进行基因工程改造，以受控的诱导表达方式在局部实体瘤中重组表达 L-门冬酰胺酶发挥抗肿瘤作用，具有选择性抗肿瘤的优点。

结构决定功能，通过对门冬酰胺酶结构的研究（如氨基酸的截短、突变等）而获得更优质的门冬酰胺酶变体，仍是一个空白领域。副作用更低的天然门冬酰胺酶并不一定完美，需要通过结构改造进行优化，这是今后的研究难点与方向。

L-门冬酰胺酶的应用并不局限在临床治疗领域，因其能够减少加热食物过程中 L-门冬酰胺与还原性糖的美拉德反应产生的致癌物质丙烯酰胺，在食品工业方面具有广阔的前景。已成功在非病原的枯草芽孢杆菌表达系统中进行重组表达，对耐高温、高酶活性的优质 L-门冬酰胺酶已有部分研究，但是重组表达的工业化生产及其使用效果仍有待食品工业化应用的检验。

8. 参考文献

[1]Kidd J G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum，horse serum or rabbit serum. Journal of Experimental Medicine，1953，98(6)：565-582.

[2]Broome J D. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its anti-lymphoma effects. Nature，1961，191：1114-1115.

[3]Mashburn L T， Wriston J C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. Archives of Biochemistry and Biophysics，1964，105：450-452.

[4]Campbell H A，Mashburn L T，Boyse EA，et al. Two Asparaginase from *Escherichia coli* B，their separation， purification and antitumor property. Biochemistry，1967，6(3)：721-730.

[5]Swain A L，Jaskolski M，Housset D，et al. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase，an enzyme used in cancer therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，1993，90(4)：1474-1478.

[6]Ahmad N，Pandit N P，Maheshwari S K. L-asparaginase gene - a therapeutic approach towards drugs for cancer cell. International Journal of Biosciences，2012，2(4)：1-11.

[7]Jha S K，Pasrija D，Sinha R K，et al. Microbial L-asparaginase：a review on current scenario and future prospects. International Journal Pharmaceutical Sciences and Research，2012，3(9)：

3076-3090.

[8]Pieters R， Hunger S P， Boos J， et al. L-Asparaginase Treatment in Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer，2011，117(2)：238-249.

[9]Prihanto A A， Wakayama M. Marine Microorganism： An Underexplored Source of l-Asparaginase. Advances in Food and Nutrition Research，2016，79：1-25.

[10]Cedar H， Schwartz J H. Production of L-Asparaginase II by *Escherichia coli.* Journal of Bacteriology，1968，96(6)：2043-2048.

[11]Jennings M P， Beacham I R. Analysis of the *Escherichia coli* Gene Encoding L-Asparaginase II，*ansB*，and Its Regulation by Cyclic AMP Receptor and FNR Proteins. Journal of Bacteriology，1990，172(3)： 1491-1498.

[12]Younes G， Alireza E， Sara R A， et al. An Optimized Medium for Screening of L-Asparaginase production by *Escherichia coli*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology，2008，4(4)：422-424.

[13]Varalakshmi V， Raju K J. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation. International Journal of Research in Engineering and Technology，2013，2(9)：121-129.

[14]Vijay B， Raju K J. Production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 under solid state fermentation using pearl millet and finger millet as mixed substrate. Journal of Chemical，Biological and Physical Sciences，2015，5(1)：366-377.

[15]Khushoo A， Pal Y， Mukherjee K J. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. Appl Microbiol Biotechnol，2005，68(2)：189-197.

[16]Shokri A， Sanden A M， Larsson G. Growth rate-dependent changes in *Escherichia coli* membrane structure and protein leakage. Appl Microbiol Biotechnol，2002，58(3)：386-392.

[17]Aghaeepoor M，Mozafari S，Shahrakl M K，et al. High level of extracellular fermentation and alternative purification of *Escherichia coli* Asparaginase II. Biharean Biologist，2011，5(2)：96-101.

[18]Upadhyay A K， Singh A， Mukherjee K J， et al. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E.coli* into active tetrameric protein. Frontiers in Microbiology，2014，5：486.

[19]Ghoshoon M B， Berenjian A， Hemmati S， et al. Extracellular Production of Recombinant

L-Asparaginase II in *Escherichia coli*：Medium Optimization Using Response Surface Methodology. International Journal of Peptide Research and Therapeutics，2015，21(4)：487-495.

[20]Zhang K，Su L Q，Duan X G，et al. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system. Microbial Cell Factories，2017，16(1)：32.

[21] Feng Y，Liu S，Jiao Y，et al. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. Subtilis* WB600 through a combined strategy. Applied Microbiology and Biotechnology，2017，101(4)：1509-1520.

[22]Doriya K， Kumar D S. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. 3 Biotech，2016，6(2)：239.

[23]Ferrara M A， Severino N M， Mansure J J， et al. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae ASP3* gene. Enzyme and Microbial Technology，2006，39(7)：1457-1463.

[24]Facchinetti C G， Gonçalves R S， Sobral R S， et al. *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II，a potential antileukemic drug：Purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification，2016，120：118-125.

[25]Costa I M， Schultz L， Araujo B P， et al. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*：an allosteric enzyme with antineoplastic activity. Scientific Reports，2016，6：36239.

[26] Pourhossein M， Korbekandi H. Cloning， expression， purification and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in *Escherichia coli*. Advanced Biomedical Research，2014，3：82.

[27]Chityala S， Venkata D V， Ahmad J， et al. High yield expression of novel glutaminase free L-asparaginase II of *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 in *Bacillus subtilis* WB800N. Bioprocess and Biosystems Engineering，2015，38(11)：2271-2284.

[28]Meena B，Anburajan L，Vinithkumar N V，et al. Molecular expression of l-asparaginase gene from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08 in *Escherichia coli*： A prospective recombinant enzyme for leukaemia chemotherapy. Gene，2016，30，590(2)：220-226.

[29]Lee S J，Lee Y，Park G H，et al. A Newly Identified Glutaminase-Free ʟ-Asparaginase (L-ASPG86) from the Marine Bacterium *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens*. Journal of Microbiology and Biotechnology，2016，26(6)：1115-1123.

[30]Nagarajan A，Thirunavukkarasu N，Suryanarayanan T S，et al. Screening and Isolation of Novel

Glutaminase Free L-asparaginase from Fungal Endophytes. Research Journal of Microbiology，2014，9(4)：163-176.

[31]Xu F，Oruna C M，Elmore J S. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. Food chemistry，2016，210：163-171.

[32]Zyzak D V，Sanders R A，Stojanovic M，et al. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2003，51(16)，4782-4787.

[33]Jia M，Xu M，He B，et al. Cloning，expression，and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2013，61(39)：9428-9434.

[34]Hong S J，Lee Y H，Khan A R，et al. Cloning，expression，and characterization of thermophilic L-asparaginase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. Journal of Basic Microbiology，2014，54(6)：500-508.

[35]Huang L，Liu Y，Sun Y，et al. Biochemical characterization of a novel L-Asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. Applied and Environmental Microbiology，2014，80(5)：1561-1569.

[36]Song P，Wang Z，Zhang X，et al. The role of autophagy in asparaginase-induced immune suppression of macrophages. Cell Death & Disease，2017，8(3)：e2721.

[37]Sakaguchi S，Higa T，Suzuki M，et al. Prophylactic use of octreotide for asparaginase-induced acute pancreatitis. International Journal of Hematology，2017.

[38]Bahreini E，Aghaiypour K，Abbasalipourkabir R，et al. Preparation and nanoencapsulation of L-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study. Nanoscale Research Letters，2014，9(1)：340.

[39]Baskar G，Chandhuru J，Sheraz F K，et al. Anticancer activity of fungal L-asparaginase conjugated with zinc oxide nanoparticles. Journal of Materials Science - Materials in Medicine，2015，26(1)：5380.

[40]Kim K，Jeong J H，Lim D，et al. L-Asparaginase delivered by *Salmonella typhimurium* suppresses solid tumors. Molecular Therapy Oncolytics，2015，2：15007.

[41]Wang Y，Qian S，Meng G，et al. Cloning and expression of L-asparaginase gene in *Escherichia coli*. Applied Biochemistry and Biotechnology，2001，95(2)：93-101.

[42]Roth G，Nunes J E，Rosado L A，et al. Recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase II

production in *Escherichia coli* fed-batch cultures. Brazilian Journal of Chemical Engineering，2013，30(2)：245-256.

Development and Application of L-Asparaginase with Better Performance and Advances in Recombinant Expression

ZENG Jie

（Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd., National Engineering Technology Research Center of Targeted Drugs, China, LianYunGang, 222047）

Abstract L-asparaginase is an anti-neoplastic agent, used in acute lymphoblastic leukemia(ALL) and lymphosarcoma chemotherapy. However, the application in clinic therapeutics is obstructed by its high costs of production. Nevertheless, the expression system of recombinant proteins have solved this problem perfectly. The intrinsic low-rate glutaminase activity of L-asparaginase, however, causes serious side-effects. In addition, L-asparaginase from bacterial origin can cause hypersensitivity in the long-term used, leading to allergic reactions and anaphylaxis. The search for new L-asparaginase sources, which shows less adverse effects, has become the focus of scholar studies. This article presented a review of recent progress in development of L-asparaginase with better performance. Furthermore, the successful expression of recombinant L-asparaginase were aslo summarized and analyzed, and the potential perspective of L-asparaginase to be used in clinic therapeutics and food industry was discussed.

Key words L-asparaginase Recombinant expression reducing adverse effects acute lymphoblastic leukemia acrylamide